d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 4.362

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

par

Christiane BLAT, née YUNG-HING

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Protéines phosphorylées du foie de rat.
Etude de leur Phosphorylation

Soutenue le 29 Mai 1970, devant la Commission d'Examen

Melle	E. LE BRETON	Président
M.	F. GROS	Examinateurs
M.	A. KEPES	
Mme	L. HAREL	Membre invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Reprinted from
Biochimica et Biophysica Acta
Elsevier Publishing Company
Amsterdam
Printed in The Netherlands

BBA 75223

PHOSPHOPROTÉINES DES MEMBRANES PLASMIQUES ISOLÉES DU FOIE DE RAT
INCORPORATION DU ^{32}P DANS CES PHOSPHOPROTÉINES

CHRISTIANE BLAT ET LOUISE HAREL
Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, Villejuif (France)

(Reçu le 25 juillet, 1968)

SUMMARY

Phosphoproteins in plasma membranes from rat liver cells.
^{32}P incorporation into phosphoproteins

Three different sorts of phosphoproteins have been characterized in plasma membranes from rat liver cells: alkali-unstable phosphoproteins, containing phosphoseryl and phosphothreonyl groups; acid-unstable phosphoproteins containing phosphohistidine; and acyl phosphate-bound phosphoproteins.

Alkali-unstable phosphoproteins from plasma membranes are more abundant than in any other structure (7 μg P/mg N protein as compared with 1.3 μg in microsomes). They are also more rapidly labelled. About 30 min after injecting ^{32}P into animals, they attain a maximum specific radioactivity, which is 4 times greater than that of the total cell phosphoproteins. The maximum specific radioactivity is reached within the same time in acid-unstable phosphoproteins as well as in P_i and ATP, which suggests that a rapid exchange of ^{32}P is occurring between these different compounds.

In contrast, after labelling *in vivo*, acyl phosphate-bound phosphoproteins from plasma membranes are found to be 10–20 times less radioactive than alkali-unstable phosphoproteins, but they are very rapidly labelled *in vitro* when isolated membranes are incubated with [γ-^{32}P]ATP. The radioactivity is K^+ and Na^+ dependent.

INTRODUCTION

AHMED ET JUDAH[1], POST, SEN ET ROSENTHAL[2], SKOU[3], HOKIN *et al.*[4], NAGANO *et al.*[5] ont suggéré que le transport des ions Na^+ et K^+ à travers la membrane était sous la dépendance de la phosphorylation des protéines des membranes plasmiques. A l'appui de cette hypothèse, ils ont montré qu'une préparation brute d'ATPase (dérivant principalement d'un mélange de microsomes et de fragments de membranes plasmiques) qui dépend des ions Na^+ et K^+, est phosphorylée en présence d'ions Na^+ et déphosphorylée en présence d'ions K^+. De plus, l'ouabaïne, inhibiteur spécifique de la pompe Na^+–K^+ diminue la phosphorylation en présence d'ions Na^+. Les phosphoprotéines actives dans la pompe Na^+–K^+ seraient de type acylphosphate pour POST, SEN ET ROSENTHAL[2], HOKIN *et al.*[4], NAGANO *et al.*[5]. Pour AHMED ET JUDAH[1] les phosphoprotéines à résidu phosphosérine joueraient un rôle important.

Jusqu'ici, à notre connaissance, aucune donnée n'existait concernant les phosphoprotéines des membranes isolées. Nous avions déjà comparé les teneurs en phosphoprotéines des différentes structures cellulaires isolées de foie de rat et montré en particulier la richesse en phosphoprotéines des noyaux[6]. Ce travail démontre l'existence d'une concentration particulièrement élevée de phosphoprotéines dans les membranes plasmiques isolées de foie et permet en outre d'en distinguer 3 sortes: des phosphoprotéines à résidu phosphosérine et phosphothréonine dont la liaison phosphate est acidostable et s'hydrolyse en milieu alcalin, des phosphoprotéines à résidu phosphohistidine dont la liaison phosphate est alcalinostable et s'hydrolyse en milieu acide, enfin des phosphoprotéines de type acylphosphate dont la liaison s'hydrolyse spécifiquement en présence d'hydroxylamine, mais s'hydrolyse aussi en milieu acide à chaud et en milieu alcalin. Nous montrons aussi que le renouvellement du phosphate des phosphoprotéines de ces membranes est plus rapide que celui des phosphoprotéines des autres structures cellulaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé des rats mâles Wistar (souche Commentry) groupés en lots homogènes de 5 animaux, mis à jeun 18 h avant le sacrifice et recevant par injection intrapéritonéale 50 μC de $H_3{}^{32}PO_4$ par 100 g de poids.

Aussitôt après décapitation des animaux, les foies sont prélevés et mis dans une solution à 0° de bicarbonate de sodium (10^{-3} M). L'homogénat est préparé à partir de 1 g de foie, homogénéisé directement dans 4 ml d'acide perchlorique à 10 % (10 g/100 ml) à 0° et centrifugé immédiatement à cette température. L'ionophorèse sur papier de l'acidosoluble, selon la technique déjà décrite[7], permet de séparer des autres constituants, l'ATP et le phosphate minéral. Après élution des taches dans HCl 0.05 M la quantité d'ATP et sa radioactivité sont déterminées sur l'éluat. La radioactivité spécifique du phosphate minéral est évaluée à partir de la quantité de phosphate dosé dans l'acidosoluble de l'homogénat et de la radioactivité trouvée sur la tache de phosphate.

Les membranes plasmiques sont préparées selon la méthode de EMMELOT *et al.*[8]. Après purification par centrifugation sur gradient de saccharose, les membranes sont lavées dans une solution de bicarbonate de sodium. La pureté des préparations est vérifiée au microscope électronique (Fig. 1). Dans certaines expériences, les membranes sont traitées par le NaCl 0.9 % à 0° et recentrifugées. Après quoi, elles sont précipitées par l'acide perchlorique 10 % et l'acido-insoluble délipidé est traité soit en milieu acide soit en milieu alcalin dans les conditions suivantes.

Pour évaluer la radioactivité spécifique des phosphoprotéines alcalinolabiles, l'acido-insoluble, provenant soit des membranes soit de l'homogénat de foie, lavé à l'acide perchlorique 10 % (qui élimine toute contamination par le phosphate minéral) et délipidé à l'alcool, est soumis à une hydrolyse alcaline (18 h à 37° en milieu KOH 1 M). Après quoi, les protéines sont précipitées par l'acide perchlorique 10 % à 0°. Le phosphate phosphoprotéique qui se trouve dans le surnageant sous forme inorganique est précipité par la technique de DELORY[9]. Sur ce précipité la radioactivité est mesurée et le phosphate est dosé par la technique de MACHEBOEUF ET DELSAL[10].

Pour évaluer la radioactivité totale des phosphoprotéines labiles en milieu acide à 95°, l'acido-insoluble est lavé rapidement à l'acide perchlorique à 0°. Lorsque le

lavage en milieu acide est fait très rapidement et à 0°, l'hydrolyse de la liaison phosphate de ces phosphoprotéines reste inférieure à 10 %. Le précipité est délipidé comme précédemment et mis en hydrolyse acide (15 min à 95° en présence d'acide perchlorique à 5%), la radioactivité est mesurée sur le surnageant après centrifugation. Cette technique se trouve justifiée par le fait qu'il n'a pas été possible de mettre en évidence d'acides nucléiques dans les membranes plasmiques, ni par le marquage, ni par le dosage des nucléotides. Seul le phosphate des phosphoprotéines s'hydrolyse en milieu acide à 95°. Les protéines sont dosées sur le culot par la technique de Lowry *et al.* modifiée par FISZER[11].

Pour évaluer la radioactivité totale des phosphoprotéines de type acylphosphate, l'acido-insoluble est lavé rapidement à l'acide perchlorique à 0° comme ci-dessus. Un lavage supplémentaire à 0° à l'acide perchlorique entraîne une radioactivité négligeable. Le précipité est mis en suspension dans du tampon acétate 0.1 M (pH 5.4) et incubé pendant 30 min à 37° en présence d'hydroxylamine 0.8 M (l'hydroxylamine est préparée à froid juste avant son utilisation par addition de 2 parties de NaOH 8 M à 5 parties d'hydroxylamine–HCl 4 M) (bibl. 4). Après l'incubation la suspension est précipitée à 0° avec 0.5 vol. d'acide perchlorique 30 % et centrifugée. La radioactivité du phosphate phosphoprotéique ainsi libéré est mesurée sur le surnageant et les protéines sont dosées sur le précipité.

La phosphohistidine a été synthétisée suivant la technique de ZEILE ET FAWAZ[12]. La phosphoarginine a été synthétisée selon la technique de MARCUS ET MORRISON[13]. Cette méthode légèrement modifiée par ZETTERQVIST ET ENGSTRÖM[14] a permis de synthétiser de la phospholysine. Par ionophorèse sur papier nous avons pu vérifier que ces acides aminés étaient bien phosphorylés.

RÉSULTATS

Phosphoprotéines alcalinolabiles des membranes plasmiques

Teneur en phosphoprotéines alcalinolabiles. Nous avons évalué la teneur en phosphoprotéines alcalinolabiles des membranes plasmiques isolées et nous l'avons comparée à celle des autres structures cellulaires (Tableau I).

Les membranes plasmiques contiennent par mg d'azote protéique 6.5 μg de phosphore de phosphoprotéines alcalinolabiles. Cette teneur en phosphoprotéines est très voisine de celle trouvée dans les noyaux et de 5–15 fois supérieure à celle trouvée dans les autres structures cellulaires isolées. Nous avons exprimé ce résultat par mg d'azote des protéines totales des membranes. Or, nous avons constaté, comme

TABLEAU I

TENEUR EN PHOSPHOPROTÉINES ALCALINOLABILES DES STRUCTURES CELLULAIRES ISOLÉES

	Mitochondries	*Phase cytoplasmique disperse*	*Microsomes*	*Membranes plasmiques*	*Noyaux*
μg P des protéines par mg N protéique	0.5 ± 0.1*	0.8 ± 0.05	1.3 ± 0.15	6.50 ± 0.37	7 ± 0.9

* Déviation standard.

EMMELOT *et al.*[8], qu'environ 30 % des protéines sont solubilisées dans NaCl à 0.9 % après une incubation de 1 h à 0°. La teneur en phosphate de ces protéines solubles est faible, de sorte que la teneur en phosphoprotéines de la fraction insoluble des membranes reste très élevée. Elle est supérieure à celle de toutes les autres structures cellulaires (8.5 μg P/mg N protéique).

En outre, nous avons pu voir, après un marquage *in vivo* par du $H_3{}^{32}PO_4$ que moins de 10 % de la radioactivité totale des protéines est lié aux protéines solubles des membranes. La préincubation des membranes dans le NaCl entraîne donc une augmentation de la radioactivité des phosphoprotéines/mg de protéines insolubles (Tableau II). Ces phosphoprotéines sont donc bien des phosphoprotéines de structure des membranes.

TABLEAU II

RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DES PHOSPHOPROTÉINES ALCALINOLABILES

Exp. No.	*Protéines totales des membranes (coups/min par mg protéine)*	*Protéines insolubles des membranes (coups/min par mg protéine)*
I	940	1300
II	315	550

Identification de la phosphosérine et de la phosphothréonine. Parmi les phosphoprotéines alcalinolabiles des membranes se trouvent des phosphoprotéines à résidu phosphosérine et phosphothréonine que nous avons mis en évidence de la manière suivante.

Les membranes sont précipitées par l'acide perchlorique 10 % à 0°, lavées à l'acide, traitées à l'alcool puis soumises à une hydrolyse acide (15 min à 95° en milieu acide perchlorique 5%). Le culot de protéines additionné de phosphosérine et de phosphothréonine non marquées est hydrolysé de manière ménagée en présence d'HCl 12 M à 37° pendant 48 h (bibl. 15). L'acide chlorhydrique est ensuite évaporé sous vide et l'hydrolysat sec est repris dans l'acide formique à 2 %. L'hydrolysat est déposé sur du papier Whatman 3 MM, l'ionophorèse est faite dans l'acide formique 2 % à pH 2.4 à 50 V/cm pendant 1 h à —2°, au "Phérograph". De la phosphothréonine, de la phosphosérine et du ^{32}P minéral sont séparés dans les mêmes conditions.

La bande de papier est ensuite révélée à la ninhydrine puis mise sous film Kodirex pour déterminer l'emplacement des composés radioactifs. La Fig. 2 représente le diagramme obtenu après exploration au densitomètre enregistreur "chromoscan" de l'autoradiographie de la bande d'ionophorèse de l'hydrolysat. Le Pic I correspond sans doute à des phosphoprotéines non hydrolysées qui ne migrent pas. C'est l'origine de l'ionophorèse. Au Pic III correspond la phosphothréonine, au Pic IV la phosphosérine (identifiées par la réaction à la ninhydrine) au Pic VI ou VII le ^{32}P minéral et au Pic II vraisemblablement des phosphopeptides. La radioactivité de ces peptides migre, après hydrolyse alcaline, comme le phosphate minéral. Par contre, le composé phosphorylé V résiste à une hydrolyse alcaline selon SCHMIDT ET THANNHAUSER[16]. Ce produit est donc acidostable et alcalinostable, il n'a pu encore être identifié.

Fig. 1. Membranes plasmiques isolées de foie de rat.

Cinétique de l'incorporation du ^{32}P dans les phosphoprotéines alcalinolabiles des membranes plasmiques. Dans les membranes plasmiques et dans l'homogénat total du foie nous avons étudié la cinétique de l'incorporation du ^{32}P dans ces phosphoprotéines entre 15 min et 4 h 30 après une injection de phosphate radioactif; nous avons conjointement déterminé le renouvellement du phosphate minéral et du phosphate de l'ATP de la cellule, ainsi que l'évolution de la radioactivité des phosphates dans le sérum.

La radioactivité injectée par voie intrapéritonéale passe très rapidement dans le sang et décroît très vite (Fig. 3).

L'évolution des radioactivités spécifiques du phosphate minéral et du phosphate de l'ATP de la cellule en fonction du temps est donnée par les courbes des Figs. 4 et 5. Dans les 2 cas le maximum est atteint 30 min après l'injection de ^{32}P. Le tracé de la Courbe I (Fig. 6) qui montre l'incorporation du ^{32}P dans les phosphoprotéines alcalinolabiles des membranes présente un maximum net 30 min après l'injection de

^{32}P puis la radioactivité spécifique de ces phosphoprotéines diminue rapidement. Le tracé de la Courbe II (Fig. 6) établie dans les mêmes conditions pour les phosphoprotéines alcalinolabiles de l'homogénat total montre un maximum vers 1 h 30 après l'injection, résultat que nous avions déjà trouvé lors d'un précédent travail[6] où nous

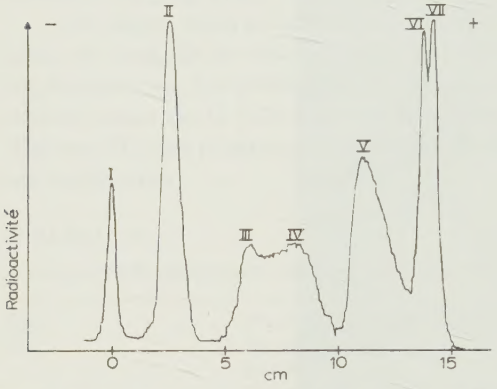

Fig. 2. Diagramme obtenu après exploration au densitomètre enregistreur Chromoscan de l'autoradiographie de la bande de papier après ionophorèse de l'hydrolysat acide des protéines des membranes. I, origine de l'ionophorèse; II, phosphopeptides; III, phosphothréonine; IV, phosphosérine; V, composé X acidostable et alcalinostable; VI ou VII, ^{32}P minéral.

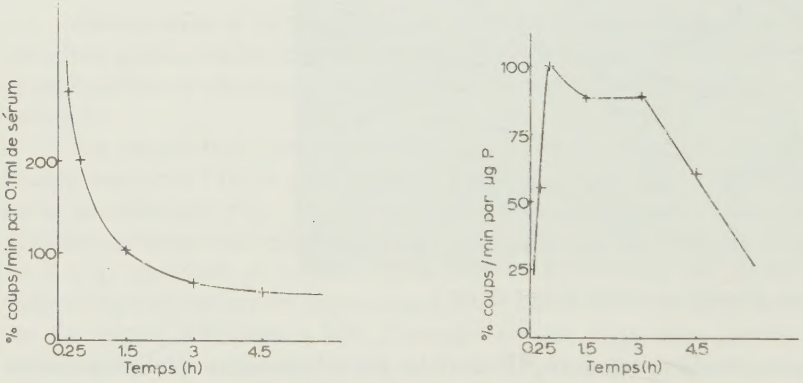

Fig. 3. Evolution de la radioactivité du sérum en fonction du temps. Radioactivité 1 h 30 après l'injection de ^{32}P = 100.

Fig. 4. Evolution de la radioactivité spécifique du phosphate minéral de la cellule en fonction du temps. Radioactivité spécifique 30 min après l'injection de ^{32}P = 100.

avions montré que, comme pour l'homogénat total, la radioactivité spécifique des phosphoprotéines alcalinolabiles des mitochondries, des microsomes et de la phase cytoplasmique disperse était maximale 1 h 30 après l'injection de ^{32}P.

Ainsi dans les membranes ces phosphoprotéines se marquent beaucoup plus vite que celles des autres structures cellulaires isolées. De plus à tous les temps étudiés leur radioactivité reste supérieure à celle des phosphoprotéines de l'homogénat total. Une demi-heure après l'injection de ^{32}P, elle est dans les membranes 4 fois supérieure à celle des phosphoprotéines de même type de l'ensemble de la cellule.

La radioactivité spécifique des phosphoprotéines alcalinolabiles des membranes atteint son maximum 30 min après l'injection de ^{32}P comme les radioactivités spécifiques du phosphate minéral et du phosphate de l'ATP de la cellule. L'échange de phosphore entre ces trois composés est donc très rapide.

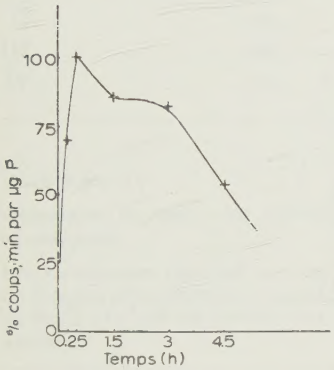

Fig. 5. Evolution de la radioactivité spécifique de l'ATP cellulaire en fonction du temps. Radioactivité spécifique 30 min après l'injection de ^{32}P = 100.

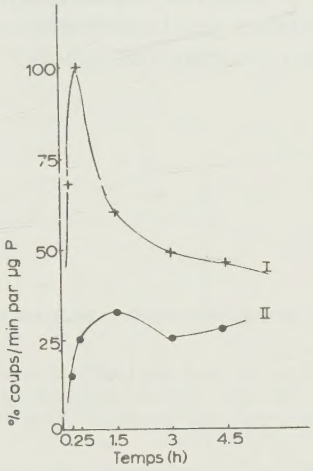

Fig. 6. Evolution de la radioactivité spécifique du phosphore des phosphoprotéines alcalinolabiles des membranes (Courbe I) et de l'homogénat total (Courbe II). Radioactivité spécifique des phosphoprotéines des membranes 30 min après l'injection de ^{32}P = 100.

Phosphoprotéines acidolabiles

Mise en évidence de la phosphohistidine. Nous avons mis en évidence dans les membranes isolées à partir de foie de rat marqué au ^{32}P, des phosphoprotéines à résidu phosphohistidine, en utilisant la méthode que nous avions déjà mise au point[7].

Après précipitation des membranes par l'acide perchlorique l'acido-insoluble délipidé par l'alcool est traité par KOH 1 M à 37° pendant 18 h. Après quoi l'addition d'acide perchlorique à 0° précipite des protéines ne contenant pas de radioactivité ^{32}P. Les phosphopeptides à phosphohistidine marqués au ^{32}P passent dans le surnageant ainsi d'ailleurs que le phosphate de la phosphosérine et de la phosphothréonine ou des phosphoprotéines de type acylphosphate. On ne trouve pas dans ce surnageant de quantité dosable de ribonucléotides, ces membranes ayant vraisemblablement une teneur très faible en acide ribonucléique. Le surnageant acide est débarrasé de l'acide perchlorique par précipitation à 0° par la potasse et mis en hydrolyse alcaline (KOH 1.5 M) à 100°, sous tube scellé, pendant 13 h après addition de phosphohistidine non marquée. La potasse est ensuite éliminée par précipitation à l'acide perchlorique et l'hydrolysat est mis en ionophorèse en tampon borate (pH 9.25) à 50 V/cm à —2° et pendant 50 min (bibl. 7). La Fig. 7 montre les diagrammes de la bande de papier révélée à la ninhydrine et de son autoradiographie explorés au densitomètre enregistreur "chromoscan". On peut voir qu'au pic de phosphohistidine révélée à la ninhydrine correspond un pic de radioactivité. On remarque à côté de la phosphohistidine radioactive un composé X particulièrement marqué; il ne s'identifie ni à la phosphoarginine ni à la phospholysine. Nous avons d'ailleurs par la suite observé

que ce composé X reste acidostable après une hydrolyse acide selon SCHNEIDER[17]. Ce produit X acidostable et alcalinostable semble être le même que celui du "Pic V" (Fig. 2). Il ne s'hydrolyse pas non plus en milieu chlorhydrique 1 M à 100° pendant 5 min, selon la technique utilisée par MANDEL ET LEDIG[18] pour libérer de la phosphosérine à partir de phosphosérine amidée qui serait, selon ces auteurs, un constituant des phosphoprotéines membranaires du cerveau. Ce produit ne semble donc pas être un composé de la phosphosérine amidée.

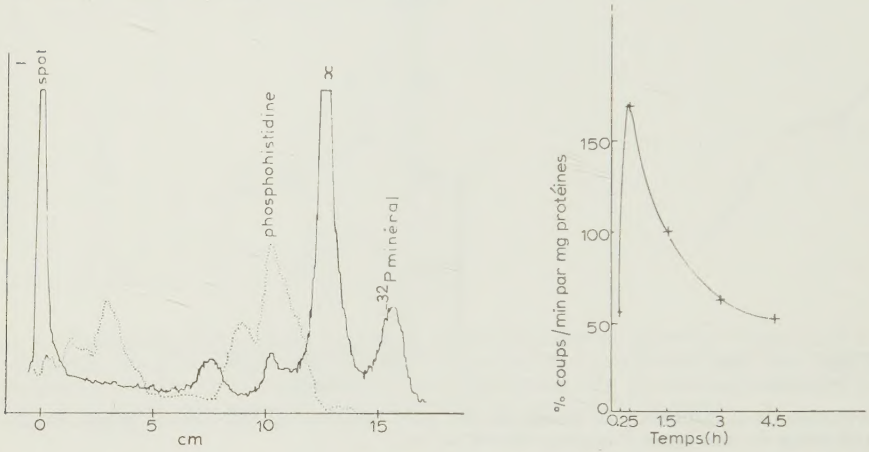

Fig. 7. Diagramme obtenu après exploration au Chromoscan de l'autoradiographie de la bande de papier après ionophorèse de l'hydrolysat alcalin des protéines des membranes. ———, radioactivité; – – – –, ninhydrine.

Fig. 8. Evolution de la radioactivité totale des phosphoprotéines acidolabiles des membranes. Radioactivité 1 h 30 après l'injection de ^{32}P = 100.

Ce composé X est alcalinosoluble mais sa liaison phosphate ne s'hydrolyse pas en milieu alcalin et il n'est pas précipité par la technique de DELORY[9] avec le phosphate minéral. De plus il reste acido-insoluble après hydrolyse acide à 95°. Il ne gêne donc en rien l'évaluation de la radioactivité des phosphoprotéines alcalinolabiles et acidolabiles.

Cinétique de l'incorporation de ^{32}P dans les phosphoprotéines acidolabiles. Nous avons étudié dans les membranes plasmiques du foie de rat après un marquage *in vivo* variant de 30 min à 4 h 30, le renouvellement du phosphate des phosphoprotéines dont la liaison phosphate s'hydrolyse à pH acide à 95° (voir MATÉRIEL ET MÉTHODES). La courbe (Fig. 8) représente l'incorporation du ^{32}P dans ces phosphoprotéines en fonction du temps. Nous observons un maximum net 30 min après l'injection de ^{32}P. Ce maximum correspond d'ailleurs au maximum de la radioactivité spécifique du phosphate minéral et du phosphate de l'ATP de la cellule (Figs. 4 et 5).

Finalement ces résultats montrent qu'il doit s'établir très rapidement un équilibre entre phosphate minéral de la cellule, phosphate de l'ATP cellulaire et phosphate des phosphoprotéines alcalinolabiles et acidolabiles.

Phosphoprotéines à liaison acylphosphate

Nous avons étudié, en utilisant la technique décrite dans MATÉRIEL ET MÉTHODES, le marquage des protéines à liaison acylphosphate dans les membranes

TABLEAU III

INCORPORATION *in vivo* DU ^{32}P DANS LES PHOSPHOPROTÉINES À LIAISON ACYLPHOSPHATE ET ACIDOLABILES 30 min APRÈS L'INJECTION DE ^{32}P

Exp. No.	*Phosphoprotéines à liaison acylphosphate (coups/min)*	*Phosphoprotéines acidolabiles (coups/min)*
I	276	5000
II	295	7250
III	696	7240
IV	312	4550

TABLEAU IV

MARQUAGE *in vitro* PAR [γ-^{32}P]ATP DES DIFFÉRENTES PHOSPHOPROTÉINES DES MEMBRANES PLASMIQUES

Les membranes (environ 0.5 mg de protéines) sont incubées pendant 30 sec à 25° en présence de tampon glycyl–glycine 0.05 M (pH 7.4), tampon phosphate de Na^+ ou de K^+ 0.003 M (pH 7.4), de NaCl 115 mM ou de KCl 115 mM et de [γ-^{32}P]ATP 0.1 μmole (environ $4 \cdot 10^6$ coups/min par μmole).

	Phosphoprotéines à liaison acylphosphate (coups/min par mg protéine)	*Phosphoprotéines acidolabiles (coups/min par mg protéine)*	*Phosphoprotéines alcalinolabiles (coups/min par mg protéine)*
Exp. I			
Na^+	1865	466	340
K^+	1000	374	206
Exp. II			
Na^+	1375	415	177
K^+	800	320	160

plasmiques isolées à partir de foies de rats marqués *in vivo* par le ^{32}P pendant 30 min. Dans ces conditions, on trouve sur ces phosphoprotéines moins de 10 % de la radioactivité totale des phosphoprotéines acidolabiles (Tableau III). Mais ces résultats peuvent s'expliquer par une hydrolyse, au cours de la préparation des membranes, de la liaison acylphosphate qui est très labile.

Par contre lorsque les membranes sont incubées *in vitro* à 25° en présence de [γ-^{32}P]ATP et de Na^+ les phosphoprotéines de type acylphosphate sont après 30 sec, beaucoup plus marquées que les autres phosphoprotéines des membranes et leur radioactivité dépend de la présence de K^+ ou de Na^+ (Tableau IV).

Nous avons remarqué d'autre part que lorsque les membranes sont incubées en présence, non pas de [γ-^{32}P]ATP, mais de ^{32}P de même radioactivité spécifique et de même radioactivité totale, l'incorporation de la radioactivité est diminuée d'environ 90 %. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux obtenus par POST, SEN ET ROSENTHAL[2], HOKIN *et al.*[4] et NAGANO *et al.*[5] avec une fraction non purifiée d'ATPase, les résultats de ce travail en cours feront l'objet d'une autre publication.

DISCUSSION

Nous avons montré que les membranes plasmiques de foie de rat sont très riches en phosphoprotéines. Nous avons mis en évidence des phosphoprotéines à résidu phosphosérine, phosphothréonine et phosphohistidine. Ces phosphoprotéines se marquent *in vivo* très rapidement; 30 min après l'injection de phosphate radioactif leur radioactivité atteint un maximum, comme d'ailleurs les radioactivités du phosphate minéral et du phosphate de l'ATP de la cellule. De plus, ces résultats laissent supposer un échange très rapide de phosphate entre ces différents composés.

Nous avons remarqué que dans les membranes les phosphoprotéines ont une vitesse de renouvellement du phosphate beaucoup plus importante que celle du phosphate des phospholipides. Après un marquage de 30 min la radioactivité spécifique du phosphate des phospholipides est 5 à 8 fois plus faible que celle des phosphoprotéines (résultats inédits).

Il serait intéressant d'identifier le composé très radioactif qui migre entre la phosphohistidine et le phosphate minéral (Fig. 7) et qui pourrait être le même que celui mis en évidence dans les mitochondries[7].

Les phosphoprotéines de type acylphosphate se marquent très rapidement lorsqu'elles sont incubées en présence de [γ-^{32}P]ATP. Pour NAGANO *et al.*[5] leur marquage atteint un maximum après 5 sec d'incubation. Nos expériences montrent qu'après 30 sec d'incubation ces phosphoprotéines sont nettement plus radioactives que les autres phosphoprotéines. Mais nous ne savons pas si les membranes de foie de rat contiennent les phosphokinases nécessaires à la phosphorylation des phosphoprotéines alcalinolabiles. La faible radioactivité de ces phosphoprotéines *in vitro* pourrait être due à l'absence de ces enzymes.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué avec la collaboration technique de N. BOIX.

Nous remercions L. BENEDETTI pour les contrôles au Microscope Electronique de la pureté des préparations de membranes et pour ses fructueuses discussions.

RÉSUMÉ

Nous mettons en évidence dans les membranes plasmiques isolées de foie de rat, trois sortes de phosphoprotéines: des phosphoprotéines alcalinolabiles à résidu phosphosérine et phosphothréonine, des phosphoprotéines acidolabiles à résidu phosphohistidine et des phosphoprotéines à liaison acylphosphate dont la liaison phosphate est hydrolysée spécifiquement par l'hydroxylamine.

La teneur en phosphoprotéines alcalinolabiles des membranes est plus élevée que celle trouvée pour les autres structures cellulaires isolées. De plus ces phosphoprotéines se marquent très rapidement puisque leur radioactivité spécifique atteint un maximum 30 min après l'injection de $H_3{}^{32}PO_4$; à ce temps elle est 4 fois supérieure à celle des phosphoprotéines de l'ensemble des autres structures cellulaires.

La radioactivité des phosphoprotéines acidolabiles atteint aussi un maximum 30 min après l'injection de ^{32}P, ce maximum correspond de plus au maximum de la radioactivité spécifique du phosphate minéral et du phosphate de l'ATP de la cellule.

Ces résultats plaident en faveur d'un échange très rapide de phosphate entre ces différents composés.

Les phosphoprotéines de type acylphosphate de la membrane, se marquent très rapidement lorsque les membranes sont incubées *in vitro* en présence de [γ-^{32}P]-ATP et leur radioactivité dépend de la présence de Na^+ ou de K^+. Par contre nous avons trouvé sur ces phosphoprotéines une radioactivité 10 à 20 fois plus faible que celle des phosphoprotéines à résidu phosphohistidine, lorsque les membranes sont préparées à partir de foies de rats marqués *in vivo* pendant 30 min par le ^{32}P.

BIBLIOGRAPHIE

1 K. Ahmed et J. D. Judah, *Biochim. Biophys. Acta*, 93 (1964) 603.
2 B. L. Post, A. K. Sen et A. S. Rosenthal, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 1437.
3 J. C. Skou, *Physiol. Rev.*, 45 (1965) 596.
4 L. E. Hokin, P. S. Sastry, P. R. Galsworthy et A. Yoda, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54 (1965) 177.
5 K. Nagano, N. Mizuno, M. Fujita, Y. Tashima, T. Nakao et M. Nakao, *Biochim. Biophys. Acta*, 143 (1967) 239.
6 C. Blat et L. Harel, *Compt. Rend.*, 259 (1964) 3659.
7 C. Blat et L. Harel, *Compt. Rend.*, 262 (1966) 1147.
8 P. Emmelot, C. J. Bos, E. L. Benedetti et Ph. Rümke, *Biochim. Biophys. Acta*, 90 (1964) 126.
9 G. E. Delory, *Biochem. J.*, 32 (1938) 1161.
10 M. Macheboeuf et J. L. Delsal, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 25 (1943) 116.
11 B. Fiszer, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1964) 403.
12 K. Zeille et G. Fawaz, *Z. Physiol. Chem.*, 256 (1938) 193.
13 F. Marcus et J. F. Morrison, *Biochem. J.*, 92 (1964) 429.
14 O. Zetterqvist et L. Engström, *Biochim. Biophys. Acta*, 141 (1967) 523.
15 S. Sperti, M. Lorini, L. A. Pinna et V. Moret, *Biochim. Biophys. Acta*, 82 (1964) 476.
16 G. Schmidt et S. J. Thannhauser, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 83.
17 W. C. Schneider, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 293.
18 P. Mandel et M. Ledig, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24 (1966) 275.